

Neuroprotekciós beavatkozások globális ischemia modelleken: a stroke megelőzésének és terápiájának egy új megközelítése

Általános bevezető

A most zárult OTKA pályázatunk egy több mint tíz éve megkezdett kutatási téma szerves folytatása volt, aminek további folytatását egy 2012- ben újabb négy évre elnyert OTKA támogatás biztosítja.

Ennek a kutatásnak fő célja a központi idegrendszeri neuroprotekció lehetőségeinek vizsgálata, legfőképpen agyi ischemiás modelleken, de más neurodegenerációs betegségek (pl. Huntington) modelljein is dolgoztunk. Beavatkozásaink ha eredményesnek bizonyultak, nem elégedtünk meg ennek megállapításával, dokumentálásával, hanem –alapkutatási pályázatról lévén szó-, elsősorban a mechanizmust igyekeztünk felderíteni. Az évek előrehaladtával, ahogy kísérleti adataink egyre gyűltek, egyre inkább kirajzolódtak azok a közös momentumok, melyek a különböző neurodegeneratív betegségek esetében a pathomechanismusok közös biológiai alapját jelentik, ill. általános érvénnyel bírnak a neuroprotektív folyamatok során is.

Általánosságban elmondható, hogy minden esetben olyan neuroprotekciós stratégiát, megközelítést ill. anyagot (vegyületet) alkalmaztunk, melyek alapvetően nem idegenek a szervezettől (endogén anyagok, ill. mechanizmusok), így pl. a kinurenineket (a triptofán metabolizmusa során keletkeznek), oxálecetesavat vagy éppen rövid idejű ischemiás attackokat, melyek az ember életében szintén előfordulhatnak.

A kutatási programot a pályázati időszak 4 éve alatt a kutatási tervnek megfelelően hajtottuk végre. A pályázat főszereplői lényegében végig azok voltak, akikkel elkezdtük a munkát. A pályázatba (a kísérletekbe) kezdettől fogva nagyszámú fiatal (B.SC.-s, M.Sc.-s és Ph.D.-s hallgatókat) vontunk be. Az ő körükben természetesen nagyobb volt a fluktuáció (végeztek, elmentek, újak jöttek). Nagy veszteségünk is volt: külföldi partnereink közül Prof. V. Teichberg (Weizmann Inst., Rehovot, Izrael) 2011-ben hirtelen meghalt, így kutatásainknak egy ígéretes vonala (neuroprotekció glutamát scavengerek alkalmazásával) átmenetileg megtorpant. Másik külföldi partnerünk Burda professzor (Szlovák Tudományos Akadémia Kassai Neurobiológiai Intézete) pedig 2012 elején stroke-t kapott, de szerencsére kiválóan felépült és novemberben újra elkezdtük a közös munkát. Korábban a részjelentések –természetszerűleg- annak megfelelően készültek, ahogy a munkatervben meghatározottak szerint egy-egy évben teljesítettük az illető időszakra vonatkozó terveket. A zárójelentésben viszont nem az időrendet követem, hanem az egyes kutatási részprogramokban elért eredményeket veszem sorba és mutatom be.

Az eredmények ismertetése, megbeszélése

A project fő célja a neuroprotekció jelenségének, mechanizmusának vizsgálata, neuroprotektív szerek keresése/fejlesztése, neuroprotektív stratégiák kidolgozása volt. Főként globális agyi ischemia modelleken (2VO, 4 VO) dolgoztunk (ritkábban használtunk focalis ischemiai modellt is). Régóta megfigyelt jelenség, hogy az agyi ischemiás állapot kialakulását rögtön követi a glutamát (Glu) nagymértékű felszabadulása. A projekt a történések legkorábbi szakaszára fókuszált, amikor a megemelkedett glutamát (Glu) szint következtében kialakuló excitotoxicitás a leginkább fenyegető jelenség. Azt vizsgáltuk, hogy milyen szerepet játszanak az excitatórikus aminosav-receptorok közül az NMDA receptorok ezekben a késleltetett sejtpusztulást eredményező folyamatokban, ill. a Glu excitotoxicitás csökkentésével milyen mértékű neuroprotekció érhető el.

Alapvetően 3 különböző módon próbáltunk neuroprotekciót elérni:

- a) magának az agyi Glu szintnek a csökkentésével
- b) glutamát receptorok közül NMDA receptor-blokkolók alkalmazásával
- c) pre- és poszt kondicionálással

Neuroprotekcio Glu scavenger alkalmazásával

Teichberg professzor biokémikus, molekuláris biológus volt, aki az agyi kapillárisok Glu-t transzportereit tanulmányozta, jellemezte (részletesen lásd utolsó review-ját: Neuroscience, 2009). Kimutatta, hogy ha a vérben csökkenjük a Glu szintjét (pl. a Glu scavenger oxálesetsav (OxAc) vagy GOT enzim adásával), ez facilitálni fogja az agy → vér irányú Glu transzportot, amivel csökkenthetjük az excitotoxicitás szintjét az agyban, és esetleg sikeres neuroprotekción is elérhetünk vele. Személyes ismeretségbe és barátságba kerülve közös kísérletek elindítását határoztuk el. Ő, ill. munkacsoportja preparálta számunkra pl. a GOT-ot, az állatkísérletek pedig Szegeden a laboratóriumunkban folytak. Vizsgáltuk a GOT ill. az OxAc szisztémás adásának hatását az agyi elektromos aktivitásra, kiváltott potenciálokra (Nagy és mtsai., Cell. Mol. Neurobiol. 2010), de a fő célkitűzés magának a neuroprotekción hatásnak a tanulmányozása volt. A kísérletek egy részében fototrombotikus úton (koponyacsonton keresztül) kiváltott focalis agyi ischemia modellen dolgoztunk, más kísérletekben globalis agyi hipoperfúziós (2VO) modellen. Hisztológiai és elektrofiziológiai módszereket használtunk. Mértük egyrészt a focalis agyi ischemia okozta lézió méretét, másrészt az ischemia okozta változásokat az agyi kiváltott válaszok térképében (feltáratlan koponya felszínről regisztrálva). Megállapítottuk, hogy 1.2 mg/100 g OxAc (i.v.) -30 percen keresztül beadva (a fototrombotikus lézió után!), szignifikánsan csökkenti a lézió méretét, a jelölt (károsodott) sejtek számát és mérsékli az agyi elektromos tevékenységben egyébként megfigyelhető károsodást (Nagy és mtsai, Cell. Mol. Neurobiol., 2009).

Egy másik kísérletsorozatban 30 perces inkomplett globalis agyi ischemia (2VO) hatását vizsgáltuk hisztológiai és *in vitro* elektrofiziológiai módszerrel a hippocampusban. Megállapítottuk, hogy bár ez a tranziens hipoperfúzió nem okoz hisztológiai kimutatható károsodást az általunk vizsgált módon (Fluoro-Jade B, S-100 és cresil ibolya), az LTP kiválthatóságát és tartósságát jelentősen csökkenti (Schaffer kollaterálisok ingerlése, fEPSP-k elvezetése a CA1 régió piramis sejtjeiről). Ez a károsodás azonban jelentősen csökkenthető, sőt kivédhető, ha az állatot a tranziens hipoperfúzió után(!) OxAc-al kezeljük. Kipróbáltunk viszonylag magasabb OxAc terhelést is (1.5 mmol) és egészen alacsony bevitt OxAc mennyiséget is (0.1 μ mol). Mint kiderült, komoly hatást érhetünk el, trauma utáni egyszeri, nagyon kis mennyiségű OxAc bevitellel is (Marosi és mtsai, Eur. J. Pharmacol. 2009).

A fentebb ismertetett kísérletek a neuroprotekción újszerű megközelítését jelentik. Az OxAc alkalmazása mellett szól, hogy endogén anyagról van szó, (bár kétség kívül, nagyobb mennyiségben vesekárosodást idézhetne elő. A kísérleteinkből azonban hamar kiderült, hogy nagyon kis mennyiségű OxAc, egyszeri adásával már neuroprotektív hatást érhetünk el). Az eredmények jelentőségét talán aláhúzta, hogy az első közlemények megjelenése után röviddel a SIGMA jelentkezett, hogy kezdjünk közös kísérleteket a protokolljaik szerint.

Ezek a kísérletek Teichberg professzor 2011. ápr. 26-án bekövetkezett halálával egy kicsit megtorpantak.

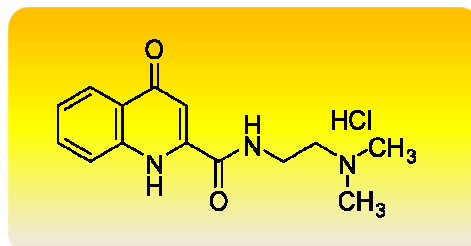
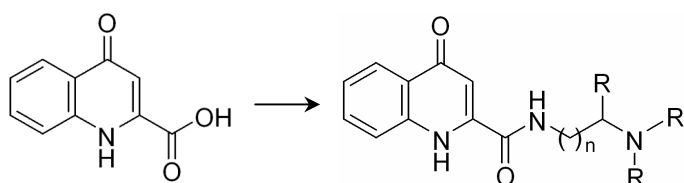
A kinureninek szerepe a neuroprotekción és azon túl...

Közel másfél évtizede, hogy találkoztam Vécsei professzorral, és rajta keresztül egy talán kevésbé ismert molekulával a kinurénsavval (KYNA), mely egyre inkább érdeklődésem középpontjába került. A kinurénsav a triptofán metabolizmusa során keletkezik test-szerte (agyban is, de egyéb szerveinkben is). A triptofán amellet, hogy fehérjékbe épül, több úton metabolizálódhat: egyrészt az un. szerotonerg útvonalon, másrészt az un. kinurenin útvonalon. A központi idegrendszerben a triptofán 95% az un. kinurenin útvonalon metabolizálódik. A

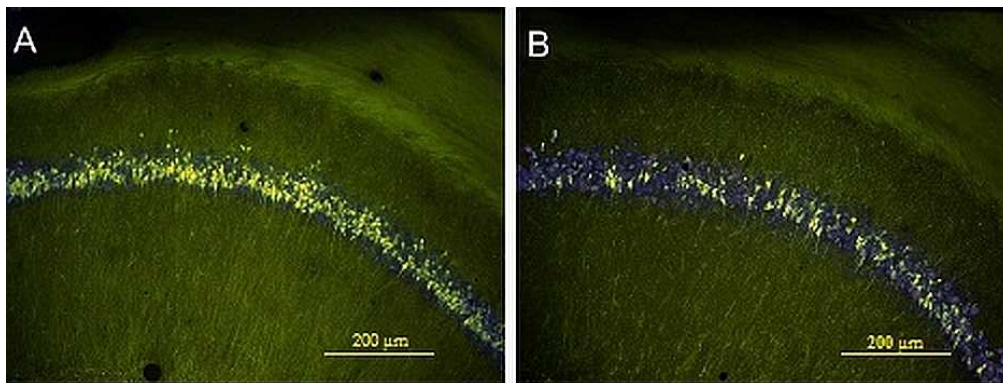
triptofánból több lépésben, egy ún. kinurenin molekulán (KYN) keresztül kinurénsav (KYNA) keletkezik, de a metabolizmus fordulhat olyan irányba is, hogy kinolin savon (QUIN) keresztül NAD^+ -ot eredményez. A kinurenin útvonal számos molekulája neuroaktív. A QUIN pl. excitotoxicitást okoz, neurotoxikus, míg a KYNA kifejezetten neuroprotektív. A KYNA máig az egyetlen ismert endogén NMDA receptor blokkoló (a Mg^{2+} -t kivéve); az NMDAR sztrichnin inszenzitív glicin kötőhelyéhez kapcsolódik. (Az elmúlt évek során kiderült, hogy a KYNA hatása ennél sokkal több támadáspontú és összetettebb – részleteket lásd később).

A KYNA, mint NMDAR blokkoló, kezdettől fogva szóba jött, mint neuroprotektív molekula. Egyetlen nagy probléma vele az, hogy nem, vagy alig jut át a vér-agy gáton (BBB). Közvetlenül a KYNA neuroprotektív céllal szisztémásan tehát nem adható. Elviekben 3 lehetőségünk van a központi idegrendszer KYNA szintjének növelésére: 1) a KYNA előanyagát az ún. KYN-t adjuk (i.v., i.p.), mely jól átjut a BBB-on, és az asztrocitákban KYNA-vá alakulva *in situ* fejt ki feltételezett neuroprotektív hatását. (Számos korábbi munkánkban beszámoltunk ezekről az eredményekről, de ezek nem esnek a jelen beszámolási időszakra, így itt nem részletezem).

2) Ezen projekt legfontosabb célja volt olyan új KYNA származékok (új molekulák) előállítás, melyek megőrzik a KYNA neuroprotektív hatását, ugyanakkor könnyen átjutnak a BBB-on, tehát szisztémásan is adhatók. Ebbe a munkába Fülöp Ferenc professzor úr gyógyszervegyészként kapcsolódott be, és az elmúlt évek során közel 200 db új molekulát szintetizáltak számunkra, melyeket sziszifuszi munkában, több szinten (*in vitro*, *ex vivo* elektrofiziológia, hisztológia, magatartásvizsgálatok) teszteltünk. (Fülöp és mtsai., Curr. Med. Chem., 2009; J. Neural Transm., 1012). Három olyan molekula akadt fenn a rostán, melyek sok szempontból ígéretesek.



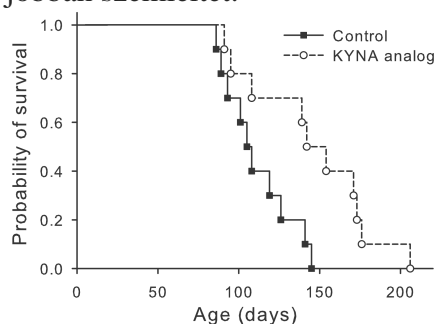
A kódnevük (SZR-72 –fent narancsszínű alapon; SZ-104 és SZR-106). A fenti ábrán az SZR-72-höz vezető szintézis vázlatát látjuk. A hatásosság tekintetében az SZ-72 esetében kritikusnak bizonyult az amid nitrogénje és a kationos központ közötti távolság (2 szénatom). Ezek tehát KYNA-amidok, melyek neuroprotektív hatása mind elektrofiziológiai módszerekkel (Nagy és mtsai, Bioorg. Med. Chem., 2011, Nagy és mtsai., Neuropharmacology, 2012; Demeter és mtsai, J. Neural Transm., 2012), mind pedig kombinált elektrofiziológiai és hisztológiai módszerekkel bizonyítható volt. Ez utóbbira egyetlen példát részleteznék csak ki: 4VO-s globális agyi ischemia modellen, hippocampusban vizsgáltuk az SZR-72 protektív hatását. A kezelt állatok CA1 régiójában jóval kevesebb károsodott piramis sejtet találtunk (Fluoro-Jade B ill. DAPI kettős jelölés), mint a kezeletlen csoportban. Ezzel párhuzamosan, *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálatokban a kezeletlen csoport állataiban az LTP indukálhatósága és tartóssága rendkívül gyenge volt, míg a kezelt csoportoké közel a kontrollok szintjét érte el. A protektív hatás nemcsak SZR-72 előkezeléssel volt elérhető, de az utókezelés is hatásos volt. (Gellért és mtsai, Eur. J. Pharmacol., 2011). Az alábbi ábra CA1 piramis sejteket mutat tranziens 4VO után. Világos sárgás-zöld pontok sérült sejtek, a kék pontok ép sejtek A: kezeletlen csoport, B: SZR-72-vel előkezelt csoport.



A fent említett KYNA-amidok minden kipróbált ischemiás modellben protektívnek bizonyultak. Felmerült ugyanakkor a kérdés, hogy ha egy NMDA receptor-blokkolót alkalmazunk neuroprotektív hatása miatt, mennyiben kell számolnunk mellékhatásokkal. Főként a kognitív funkciók gyengülése esetleg károsodása jön elsősorban számításba. Számos kísérletet végeztünk ennek tesztelésére. Örömkre szolgált, hogy azok a dózisok, melyekkel már effektív neuroprotektió volt érhető, még nem jártak deficittel a kognitív funkciók terén (Gellért és mtsai., J. Neural Transm., 2012).

Vizsgáltuk az új analóg beadás utáni stabilitását, koncentrációját is a szervezetben és megállapítottuk, hogy beadás után hosszabb ideig egyenletes a szintje és stabil marad a molekula (Zádori és mtsai., J. Pharm. Biomed. Anal., 2011).

Miután az új KYNA analógunk minden ischemiás modellen, minden módszerrel hatékony neuroprotektív molekulának mutatkozott, érdemesnek látszott megvizsgálni más neurológiai betegségek modelljeiben is. Ezen vizsgálatok közül egyet emelek ki részletesebben. Transzgenikus egereken (Huntington modellek) vizsgáltuk az SZR-72 kezelés hatását. A testtartásban, egyéb neurológiai és magatartási tesztekben megmutatkozó pozitív hatás mellett talán a leglátványosabb az élettartamra kifejtett hatása, melyet az alábbi ábra mindennél jobban szemléltet.



(Zádori és mtsai., J. Neural. Transm., 2011).

Az SZR-72 mellett, mint említettem, van másik két molekulánk is, melyek tesztelése még folyamatban van. Az SZR-104 jelű molekulánk pl. rendkívül jól hatástalanítja a pentylenetetrazol-indukálta görcsöket (Demeter és mtsai., J. Neural Transm., 2012).

Teoretikusan a 3.) lehetőség az agy KYNA szintjének növelésére az lehet, hogy enzimgátlókkal eltérítjük a metabolikus útvonalat úgy, hogy ne QUIN keletkezzék, hanem inkább KYNA. Ehhez pl. a kynurenine 3-monooxygenase-t ill. a kynureninase enzimeket kellene blokkolni. Ezek a célkitűzések még nem szerepeltek ebben a projektben, de Japán kollaborációban elkezdünk ezen is dolgozni.

Az elmúlt évtizedben világszerte egyre nagyobb figyelem irányult az agyi kinureninekre. Az a tény, hogy számos neurológiai betegség modelljén hatnak, számos betegség pathomechanizmusában szerepet játszhatnak, amit magunk is vizsgáltunk és tárgyaltunk (Kincses és mtsai., J. Cell. Mol. Med., 2010; Sas és mtsai., J. Neurol. Sci., 2010; Zádori és mtsai., J. Cell. Mol. Med., 2011; Párdutz és mtsai., J. Neural Transm., 2012; Szabó és mtsai.,

J. Neurol. Sci., 2011) egyre inkább erősítette azt a korábban is megfogalmazódott feltételezést, hogy itt nem csak (és lehet, hogy nem elsősorban!) a KYNA NMDA receptor blokkoló hatásával kell számolni. Magunk is leírtuk korábban *in vitro* elektrofiziológiai kísérletek alapján, hogy maga a KYNA különböző koncentrációkban másképp viselkedik: nanomólis koncentrációban serkent, mikromólis koncentrációban gátol (Rózsa és mtsi. J. Neural Transm., 2008). Kiderült, hogy a KYNA a korábban megismert „klasszikus” gátló hatása mellett, (ami az NMDAR sztrichnin inszenzitív glicin kötőhelyére történő bekötődésnek tulajdonítható), kötődik az AMPA receptorokhoz is, de nagyon fontos hatóhelyei még (és ezek jelentősége csak az utóbbi időben kezd kirajzolódni): a) a **periszinaptikus NMDA receptorok** valamint a b) **preszinaptikus nikotinerg acetilkolin receptorok (NACHR)**. Ezen utóbbi támadásponton keresztül képes a KYNA a glutamaterg végződésekből a Glu felszabadulás modulálására. Az irodalmat és saját eredményeinket tanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy a triptofán metabolikus termékei sokkal nagyobb szerepet kapnak a központi idegrendszer működésének szabályozásában, modulálásában, mint azt korábban gondoltuk. Találunk közöttük excitatórikus (és így potenciális neurotoxikus) molekulákat (pl. QUIN) és találjuk magát a neuroprotektívnek tartott KYNA-t is, melyről az is kiderült, hogy koncentrációtól függően maga is lehet gátló és serkentő is (más-más receptoron hatva). Mindezek, normál körülmények között, egy rendkívül finoman kiegyensúlyozott viszonyok mellett, hozzájárulnak a központi idegrendszer zavartalan működéséhez. Ha ez a kényes egyensúly megbomlik, annak szerepe lehet a központi idegrendszer patológiás állapotának kialakulásában (Szalárdy és mtsai., Curr. Top. Med. Chem., 2012). Ha a triptofán metabolitok egyensúlya tartósan és jelentősebben eltolódik az excitatórikus tulajdonságú molekulák javára, az mitokondriális károsodáshoz és különböző neurodegeneratív betegségekhez vezethet (Szalárdy és mtsai., Curr. Med. Chem., 2012; Zádori és mtsai., J. Neurol. Sci., 2012; Zádori és mtsai., J. Neural Transm., 2012).

A kinureninekről szerzett kísérleti tapasztalatainkat és jelenlegi tudásunkat egy nagyobb lélegzetvételű munkában foglaltuk össze, amit a projekt zárása és megkoronázásaként a Nature Rev. Drug Disc.-ben sikerült közzélnünk (Vécsei, Szalárdy, Fülöp, Toldi: Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions, 2012).

Ezeknek a nagy kísérletsorozatoknak, (melyek során, mint korábban is jeleztem, főként agyi ischémiás modelleken dolgoztunk) megvannak a maguk „melléktermékei”. Persze, ezek csak akkor nevezhetők melléktermékeknek, ha szigorúan csak a projekt fő „csapásirányát” nézzük. Egyébként pedig nagyon fontos eredmények születhetnek így. Ilyennek gondoljuk pl. azt a megfigyelésünket, hogy rendkívül nagy különbség van a Wistar és a Sprague-Dawley patkányok között globalis ischémia tolerancia tekintetében (Fuzik és mtsai., Neuroscience, 2012). Nagyon nem mindegy, hogy milyen állatokon végezzük az ilyen típusú kísérleteinket!

Neuroprotekciós vizsgálatok pre- és poszt-kondicionálással

A pályázat célul tűzte ki a neuroprotekciós célú beavatkozások egy harmadik típusú megközelítésének, a pre- és poszt-kondicionálásnak a vizsgálatát is. Először szívizomban írták le, ma már tudjuk, hogy más szövetekben, így az agyszövetben is aktiválni lehet a sejteknek azt az eredendően meglévő, természetes védekező mechanizmusát, mely megvédheti őket pl. egy egyébként végzetes ischémiás attack-tól. Ezen védekező rendszer aktiválásához valamilyen subletális shock szükséges, ami lehet akár egy rövidebb ischémiás periódus is (TIA), de lehet más stresszor is (pl. egy vegyület: bradikinin, kainsav stb.). (Mint látjuk, ezen a szinten is érvényesül az „Ami nem öl meg, az megerősít” elve). Ezekben a vizsgálatokban 2VO-s és 4VO-s állatokon dolgoztunk, pre- és poszt-kondicionáló ingerként TIA-t is de vegyületeket is használtunk. Hisztológiai vizsgálatokban károsodott sejtszámokat ill. infarktus méreteket határoztunk meg. *In vitro* elektrofiziológiai vizsgálatokban pedig

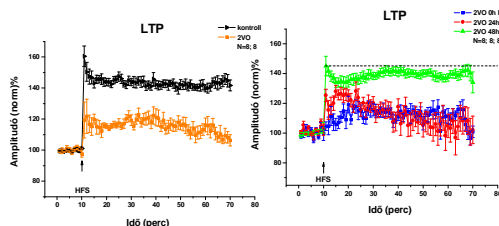
hippocampalis LTP indukálhatóságát és tartósságát teszteltük (Schaffer-collaterális ingerlés – CA1 piramis sejtrétegből fEPSP elvezetés). Nagyszámú kísérletet végeztünk el a hatékony pre- és poszt kondicionálás optimális paradigmáinak megtalálásához. Főbb megállapításaink a prekondicionálással kapcsolatban a következők:

- egy (de legfeljebb kettő) TIA elégséges a maximális ischémia tolerancia indukálásához
- az ischémia prekondicionálással aktivált neuroprotekciónak 1 és 3 nap között volt a leghatékonyabb
- a fentiekhez hasonló megállapításokat lehetett tenni MCAO-val kiváltott fokális ischémia esetében is (Prof. Maria Grazia De Simoni és PhD-s hallgatója 2010 tavaszán két hetet nálunk töltött és ők készítették az MCAO-s egereket).

Gyakorlati relevanciája azonban sokkal inkább a poszt kondicionálásoknak lehet. Az utóbbi időben ennek részletes vizsgálatát kezdtük el. Ezekben a kísérletekben poszt kondicionáló ingerként (second pathophysiological stress) 5 mg/kg kainsavat adtunk (i.p.) 0, 24 és 48 órával valamint 10 nappal a fő ischémia attack után. A protektív hatást egyrészt az LTP kiválthatóságán és tartósságán teszteltük, másrészt Golgi-cox technikával vizualizáltuk és dendrittüskék számoltunk a hippocampus CA1 régiója piramis sejtjeinek apikális dendritjén. A kísérletek azt mutatták, hogy a 48 óra után alkalmazott kainsav kezelés hatásos volt, míg a többi kevésbé ill. egyáltalán nem (Nagy és mtsai, Neuropharmacology, 2011)

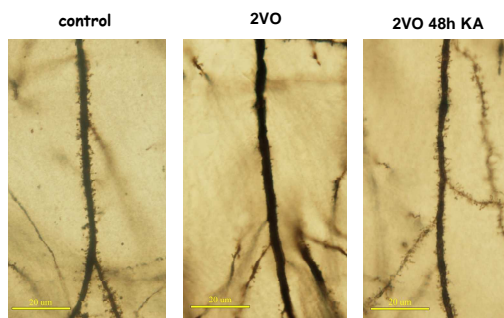
Results I.

In vitro electrophysiology - 3 days survival



Neuropharmacol. 2011 61(5-6):1026-32.

Results II.



Dendrite spines on apical dendrite of pyramidal neurons in CA1 region. scale: 20µm. 600X

Neuropharmacol. 2011 61(5-6):1026-32.

A Results I. ábrarész bal diagramján feketével egy kontroll (ischémia attack-on át nem esett) állat LTP-jét látjuk, míg narancs színnel egy 30 perces 2VO-t elszenvedett állat LTP-jét. A jobb ábrarészben piros színnel egy olyan 2VO-s állat LTP-jét mutatjuk, mely 24 órával a 2VO után poszt kondicionálásban részesült. Kékkel pedig egy olyan állatét, mely a kainsavat közvetlenül a 30 perc 2VO után kapta. Látható, hogy egyik beavatkozás sem volt sikeres. Ezzel szemben, amikor a KA-at a 2VO után 48 órával adtuk (zöld színnel), az LTP a kontroll állat LTP-jéhez volt hasonlítható.

A Results II. alatt mutatott hisztológiai eredmények a fentiekkel összhangban voltak: a dendrittüskék száma 2VO alatt rendkívül lecsökkent, míg ha 48 órával később kainsavat adtunk, a dendrittüskék száma ismét nagyobb lett (a kontrollhoz hasonlítható mértékben).

Ezeket a vizsgálatokat az új OTKA támogatással tovább folytatjuk, többek között pécsi kollégákkal kollaborációban molekuláris biológiai módszerekkel kiegészítve, mikroRNS vizsgálatokat végzünk.

De ez már az új OTKA projekt beszámolójának lesz a tárgya...